

Identification de certaines souches de mycoplasmes de la chèvre à l'espèce *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*

par P. PERREAU (*)

(avec la collaboration technique de C. LEGOFF et A. BREARD)

RESUME

Les méthodes actuelles les plus sûres d'identification des mycoplasmes (précipito-diffusion en milieu gélifié, immunofluorescence, inhibitions de croissance et de métabolisme, électrophorèse en gel de polyacrylamide) montrent qu'on peut isoler chez la chèvre des souches de mycoplasmes appartenant à l'espèce *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, agent de la péripneumonie bovine.

Depuis plusieurs années déjà, on sait que des souches de mycoplasmes isolées chez des chèvres atteintes le plus souvent, mais non exclusivement, de pleuropneumonie ou de simple pneumonie lobaire, ont des affinités sérologiques étroites avec *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*.

Un certain nombre de travaux tendant à comparer les caractères culturels, les propriétés antigéniques et le pouvoir pathogène des diverses souches caprines et de *Mycoplasma mycoides* ont été achevés, dans le dessein évident de clarifier un peu la systématique, encore embryonnaire, des mycoplasmes des chèvres.

Pour ne rappeler que les plus récents, citons ceux de BARBER et YEDLOUTSCHNIG (1), de COTTEW et collab. (4), de HUDSON, COTTEW et ADLER (7) et de EL NASRI (5, 6).

Au cours d'un travail sur l'application de la méthode d'immunofluorescence à l'identifica-

tion des mycoplasmes et plus particulièrement au diagnostic de la péripneumonie (8), nous avons déjà considéré comme de vraies souches de *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* deux souches d'origine caprine dénommées Vom et C 11, au vu des réactions croisées parfaites qu'elles montraient vis-à-vis des sérums anti-*mycoides* et vice versa.

Nous essayons aujourd'hui d'apporter la démonstration définitive de cette identité, en rassemblant les résultats d'un certain nombre de tests.

MATERIEL ET PROTOCOLES TECHNIQUES

A. Souches

1. Les souches de référence pour *Mycoplasma mycoides* sont les souches Afadé et B 17, isolées au Tchad par le laboratoire de Farcha et la souche Fatick isolée au Sénégal par le laboratoire de Hann, à partir de lésions naturelles de péripneumonie bovine.
2. Les deux souches caprines examinées ici sont les souches Vom et C 11; pour l'instant rappelons simplement que la souche C 11 n'a qu'une ou deux subcultures depuis

(*) Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, 10, rue Pierre Curie, 94 Maisons-Alfort.

son isolement alors que nous ignorons l'ancienneté de l'autre souche, conservée autrefois au laboratoire de Vom en Nigéria et considérée comme la souche originelle de Longley.

3. Accessoirement, trois autres souches d'origine caprine ont servi plusieurs fois d'éléments de comparaison : OSB 42, Farcha et Pg 3, cette dernière étant représentative de l'espèce *Mycoplasma mycoides* var. *capri*. Le comportement sérologique de ces souches est identique et les réactions croisées excellentes.

B. Antigènes

A partir des souches examinées, deux types d'antigènes ont été préparés pour les agglutinations indirectes et les précipito-diffusion en milieu gélifié :

a) le galactane (ou l'antigène supposé tel) selon une méthode comparable à celle de BUTTERY et PLACKETT (2) dérivée du procédé original de Westphal.

b) un antigène total obtenu par un traitement aux ultra-sons d'une suspension dense de mycoplasmes (9).

C. Sérums

La plupart des immunosérums employés ont été préparés sur mouton selon un protocole déjà décrit (8); les autres sont des sérums de lapin.

D. Protocoles techniques

Les caractères culturels banaux (morphologie des colonies, métabolisme glucidique, etc.) ne présentant pour cette étude aucun intérêt d'ordre distinctif, nous avons retenu comme seuls critères les résultats des tests suivants :

1. Recherche du galactane, support de la spécificité *mycoides*, au moyen des méthodes classiques d'agglutination indirecte (hématies fraîches ou formolées) et de précipito-diffusion en milieu gélifié.
2. Immunofluorescence croisée : la méthode a déjà été décrite (8).
3. Inhibition de croissance sur milieu solide par la méthode des disques, selon un procédé analogue à celui de CLYDE (3), à quelques modifications mineures près portant sur le diamètre des disques et les quantités de sérum

mis en jeu : les disques ont ici 10 mm de diamètre et sont saturés par 0,075 ml de sérum non dilué.

4. Inhibition du métabolisme selon un procédé semblable à celui de TAYLOR-ROBINSON et collab. (12) : ici c'est le simple milieu au tryptose qui est employé, après addition de glucose à 1 p. 100 et de rouge de phénol à 0,002 p. 100 (en concentrations finales). Chaque alvéole des plaques (Linbro IS-FB-96) reçoit 0,05 ml de sérum dilué, 0,05 ml d'inoculum et 0,1 ml de milieu. Dilutions sériques et dilutions de la suspension de mycoplasmes sont faites dans ce même milieu : les premières vont du 1/10 au 1/5.120 en concentration terminale, les secondes de 10^{-2} à 10^{-7} . La lecture est faite lorsque ce « colour-test » est stabilisé, c'est-à-dire au bout d'une semaine en général.

5. Electrophorèse comparative en gel de polyacrylamide, en suivant de près le protocole mis au point par RAZIN et ROTTEM (11), avec quelques différences portant uniquement sur l'appareillage.

Nous avons, en effet, utilisé le système préparatif Acrylophor Pleuger (mod. 141) dont nous disposions et donc employé des quantités plus importantes d'antigène puisque les tubes sont d'assez grandes dimensions : 12×100 mm. Chaque gel a reçu à sa partie supérieure 1 ml d'antigène préparé selon la méthode originale; les électrophorèses ont duré 3 heures au minimum, avec une tension de 15 mA par tube.

Le colorant « marqueur » est la rhodamine B en solution à 0,5 p. 100; les gels sont colorés au Noir-Amide 10 B (Merck) à 0,6 p. 100 durant 30 minutes, puis décolorés soit par électrophorèse soit par simples lavages dans un bain d'acide acétique à 7 p. 100.

RESULTATS

1. Recherche de l'antigène de surface (galactane)

Par la méthode de Westphal, à partir des souches Vom et C 11, on peut extraire un antigène de surface identique au galactane de *Mycoplasma mycoides*, comme le montrent sans conteste les tests de précipito-diffusion (voir photos n°s 1 et 2); la continuité de la ligne de précipitation est évidente et, en fait, on observe un anneau autour du réservoir de sérum.

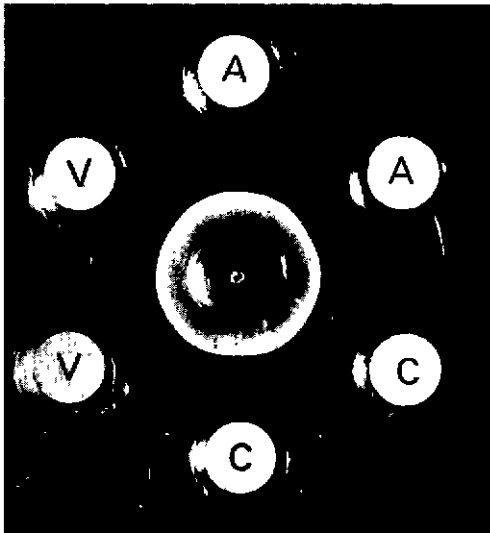


Photo n° 1

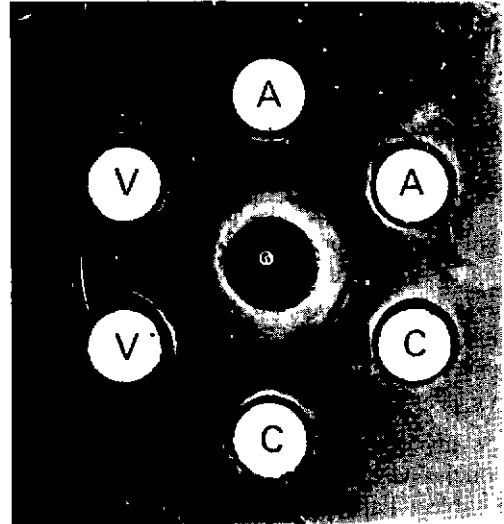


Photo n° 2

Cupule centrale : sérum précipitant anti-*M. mycoides* (Fatick).

A la périphérie. A. Galactane de la souche *mycoides* Afadé pour la photo 1.

Antigène total « ultra-sons » de la même souche pour la photo 2.

C. Mêmes antigènes préparés avec la souche caprine C11 et même disposition.

V. Mêmes antigènes préparés avec la souche caprine Vom et même disposition.

On voit sur la photo n° 2 (antigènes « ultra-sons ») que la communauté antigénique s'étend à d'autres antigènes que le galactane.

Ces mêmes antigènes s'adsorbent sur les hématies fraîches ou formolées et, en hémagglutination passive, les réactions croisées sont excellentes avec les sérums anti-*mycoides* Afadé,

anti-Vom et anti-C11. Tous les titres sont élevés et d'une valeur sensiblement égale pour les trois antigènes vis-à-vis d'un même sérum (voir photo n° 3).

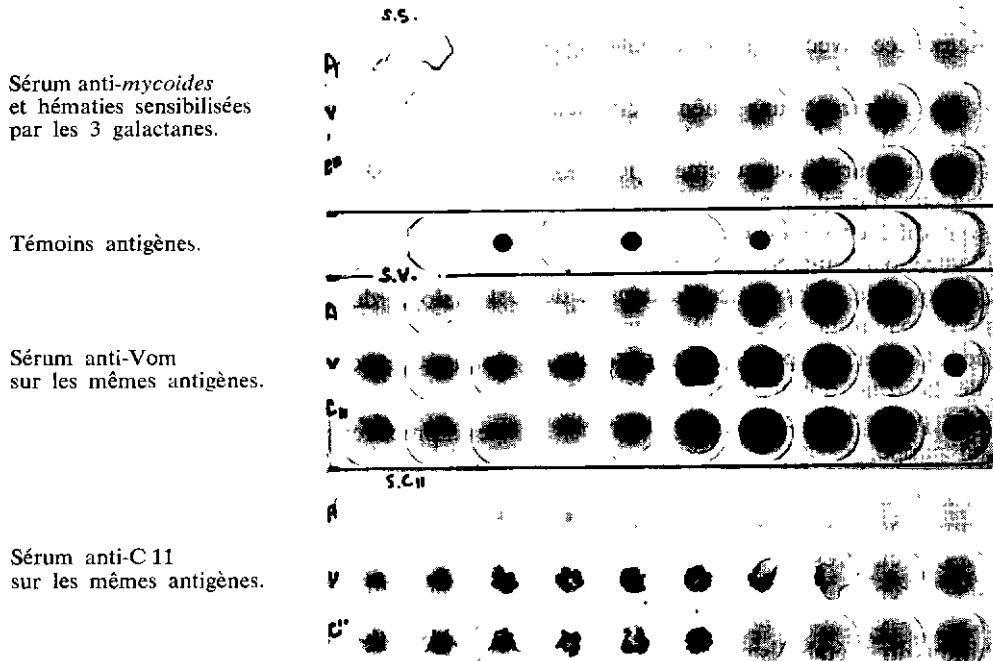


Photo n° 3. — Le titre d'hémagglutination positive est d'au moins 1/5120; il est supérieur à 1/10240 dans la majorité des séries.

Ces résultats sont acquis aussi bien avec les « galactanes » qu'avec les antigènes totaux obtenus par les ultra-sons.

2. Immunofluorescence croisée

Les résultats en ont été déjà rapportés (8), mais nous les rappelons ici en insistant sur le fait qu'un conjugué anti-*mycoides* ou anti-Vom ou anti-C 11 peut servir indifféremment pour caractériser *Mycoplasma mycoides* non seulement dans des cultures, mais aussi dans les coupes histologiques des lésions de péripneumonie.

Les mycoplasmes de la souche Vom ou de la souche C 11 assurent dans des conditions semblables l'absorption d'un conjugué anti-*mycoides*.

Cette réaction nous semble vérifier la présence du galactane à la surface des germes, les antigènes superficiels ayant un rôle majeur dans ce procédé.

3. Inhibition de croissance sur milieu solide

Ici encore, les résultats sont clairs : à condition de disposer de sérums d'un titre correct, un anneau d'inhibition est toujours nettement autour des disques imprégnés par les trois sérums, quelque soit la souche mise en culture.

La photo n° 4 donne un bon exemple de ce qu'on peut observer : sur une boîte de Pétri ensemencée avec la souche Fatick, les trois sérums anti-*Mycoides* Fatick, anti-C 11 et anti-Vom montrent une même efficacité. Dans de tels tests, il faut se garder de vouloir trouver une largeur rigoureusement identique aux trois zones d'inhibition, car d'une part les sérums sont différents bien que tous très positifs et d'autre part, malgré les soins apportés à la préparation de telles boîtes, la densité des colonies n'est pas toujours égale autour de tous les disques. Ce dernier point est important, la largeur de la zone d'inhibition étant en gros inversement proportionnelle à la richesse de la culture en nappe.

Aucune zone d'inhibition n'existe lorsque des disques imprégnés de ces mêmes sérums sont placés sur des cultures en nappes des souches OSB 42 et Farcha.

4. Inhibition du métabolisme

Sur les plaques, les schémas d'inhibition par un sérum anti-*mycoides* sont identiques pour

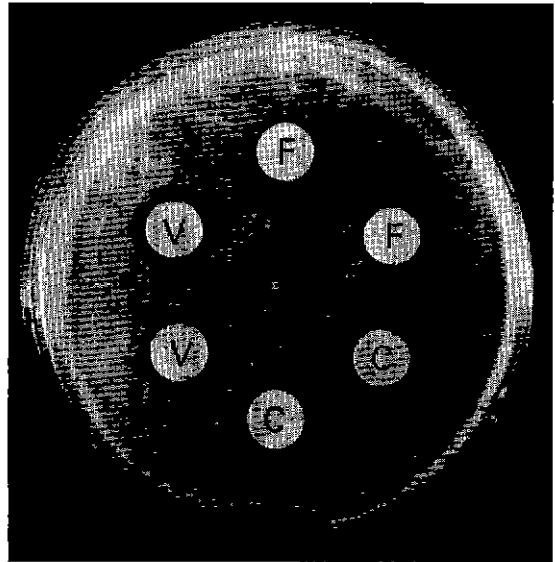


Photo n° 4. — Exemple d'inhibition de croissance sur milieu solide :

Boîte ensemencée avec *M. mycoides* Fatick.

F. Sérum anti-Fatick.

C. Sérum anti C 11.

V. Sérum anti-Vom.

les souches de référence de *Mycoplasma mycoides* et les deux souches Vom et C 11. Le même titre est retrouvé : 0,05 ml de sérum au 1/80 inhibe complètement la culture dans les alvéoles qui ont reçu 0,05 ml de la suspension de mycoplasmes à la dilution 10^{-5} .

5. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Ce test apporte la preuve, qui nous semble définitive, qu'aucune différence de composition antigénique n'est décelable entre *Mycoplasma mycoides* d'une part et les souches Vom et C 11 d'autre part.

La photo n° 5, encore qu'elle ne révèle pas les lignes les plus fines, montre sans équivoque l'analogie de structure protéique des trois souches étudiées, analogie si flagrante qu'on est obligé de conclure à l'identité d'espèce.

Ce résultat est important à considérer, les tests précédents ne mettant en évidence, somme toute, que l'identité d'une partie des antigènes.

COMMENTAIRES

Les deux souches Vom et C 11 isolées chez la chèvre doivent donc être considérées comme appartenant à l'espèce *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, agent de la péripneumonie bovine.



Photo n° 5. — Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

A. Antigène *Mycoides* Afadé.
C. Antigène C 11.
V. Antigène Vom.

Si nous ignorons aujourd'hui les conditions dans lesquelles fut isolée la souche Vom, nous le savons très exactement pour la souche C 11 (chèvre n° 11). En 1962, un troupeau de 150 chèvres destinées à la production du vaccin bovine caprinisé est envoyé au laboratoire de Fort-Lamy en pleine saison des pluies; après un voyage de 150 km à pied, les animaux sont mis en observation en étable close, mais dans des conditions d'entassement assez sévères. Une pneumonie enzootique apparaît alors très vite et bientôt chaque jour une dizaine de chèvres succombent. Les lésions pleurales sont rares; il s'agit surtout de pneumonie lobaire (lobes apicaux et cardiaques). Des fragments de poumon hépatisé sont prélevés sur 12 animaux pour examen histologique et microbiologique.

Les diverses coupes montrent des lésions qui n'ont aucun caractère de spécificité (*); c'est surtout une branchiolo-alvéolite suppurée en foyers disséminés, avec aussi un œdème inflammatoire des cloisons interlobulaires et quelques infiltrats nodulaires lymphocytaires

péribronchiques. On n'observe ni lésion de type viral, ni présence de germes de la famille des Chlamydiacées.

A partir de ces 12 poumons, on isole en associations diverses des streptocoques, des *Pasteurella* sp., et sept fois des mycoplasmes.

Ces sept souches ne semblent pas identiques et six sont toujours conservées; cinq ne sont pas encore identifiées, mais la sixième est celle de la chèvre 11, qui d'emblée se multiplie très facilement avec tous les caractères cultureux de *Mycoplasma mycoides*, et notamment avec de longues formes filamenteuses dans les cultures jeunes.

Retenons que, chez cet animal, aucune bactérie pathogène n'est trouvée associée au mycoplasme qu'on peut donc considérer comme le responsable des lésions.

Par la suite, cette souche fut injectée à des bovins par la voie endobronchique (10), sous forme de culture (20 ml); aucun trouble ne s'ensuivit et aucune lésion ne fut trouvée 3 mois après à l'abattage des bouvillons éprouvés. Dans les mêmes conditions, une autre souche caprine (M. 108) provoquait chez deux animaux des lésions très circonscrites de péripneumonie. On ne peut attribuer à ces épreuves une valeur définitive car on sait aujourd'hui que l'infection par la voie bronchique connaît de bien meilleurs succès avec du matériel lésionnel qu'avec de simples cultures. On peut voir aussi, dans les travaux publiés, que la souche Vom injectée par voie trachéale à quatre chèvres (COTTEW et collab., 4) n'en a infectée aucune alors qu'en d'autres mains (BARBER et YEDLOUTSCHNIG, 1) et injectée par la voie intramusculaire elle s'est révélée très pathogène pour la chèvre, le mouton et le veau.

Nous devons évoquer ici les souches Pillai et « 0 goat » étudiées par HUDSON et collab. (7), non différenciables sérologiquement de *Mycoplasma mycoides*; il serait intéressant de voir par les mêmes méthodes si l'on peut les identifier formellement à *Mycoplasma mycoides*.

La chèvre peut-elle intervenir dans la transmission de l'infection péripneumonique aux bovins? Aucun exemple n'a pu le montrer jusqu'à présent et cependant en Afrique tropicale chèvres et bovins vivent souvent côte à côte.

L'isolement de *Mycoplasma mycoides* dans des lésions pulmonaires de chèvres nous renforce dans cette conviction que la pleuro-

(*) Examen histologique effectué par notre confrère J. C. Guillon, service de Microbiologie animale, Institut Pasteur de Paris, que nous remercions vivement ici.

pneumonie contagieuse caprine est un syndrome bien plus qu'une infection spécifique, dont plusieurs espèces de mycoplasmes peuvent être responsables.

Dans le foyer que nous avons pu observer et d'où est sorti cette souche C 11, les agents infectieux étaient multiples et leur action déclenchée à coup sûr par un « stress » important; *Mycoplasma mycoides* n'était sans doute là qu'à titre de germe de sortie.

CONCLUSIONS

Deux souches de mycoplasmes isolées chez la chèvre et connues depuis plusieurs années pour leur parenté sérologique étroite avec *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* sont identifiées définitivement à cette espèce.

La pluralité étiologique des infections pleuro-pulmonaires des caprins se trouve une fois de plus confirmée et il va devenir nécessaire de savoir quel rôle exact peut jouer la chèvre dans l'épizootologie de la péripneumonie bovine.

SUMMARY

Identification of some goat mycoplasma strains with *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*

The most reliable actual methods for identifying mycoplasma species (gel precipitation, fluorescent antibodies, growth and metabolism inhibitions, polyacrylamid-gel electrophoresis) show that it is possible to isolate, from goats, mycoplasma strains belonging to the species *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, causative agent of contagious bovine pleuropneumoniae.

RESUMEN

Identificación de ciertas cepas de micoplasmas de la cabra a la especie *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*

Los métodos actuales más seguros de identificación de los micoplasmas (precipito-difusión en medio gelificado, inmunofluorescencia, inhibición de crecimiento y de metabolismo, electroforesis en gelificación de poliacrilamido) muestran que se puede aislar en la cabra cepas de micoplasmas perteneciendo a la especie *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*, agente de la peripneumonia bovine.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARBER (T. L.) et YEDLOUTSCHNIG (R. J.), « Mycoplasma infection of goats », *Cornell Vet.*, 1970, **60** (2): 297.
2. BUTTERY (S. H.) et PLACKETT (P.), « A specific polysaccharide from *Mycoplasma mycoides* », *J. Gen. Microbiol.*, 1960, **23**: 357.
3. CLYDE (W. A.), « Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera », *J. Immunol.*, 1964, **92** (6): 958.
4. COTTEW (G. S.) et collab., « Mycoplasmas of caprine pleuropneumoniae in Turkey and their relationship to other mycoplasmas of goats and *M. mycoides* var. *mycoides* », *J. comp. Path.*, 1969, **79**: 541.
5. EL NASRI (M.), « Mycoplasma from contagious caprine pleuropneumoniae », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1967, **143**: 298.
6. EL NASRI (M.), « Studies on *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* and *Mycoplasma mycoides* var. *capri*. I. Cross-pathogenicity and cross-protection tests », 4^e Réunion du comité d'experts FAO/OIE/OUA/ sur la péripneumonie bovine, Paris, 15-20 mars 1971.
7. HUDSON (J. R.), COTTEW (G. S.) et ADLER (H. E.), « Diseases of goats caused by mycoplasmas a review of the subject with some new findings », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1967, **143**: 287.
8. PERREAU (P.), GAYT (P.) et MONNIER (J.), « La méthode d'immunofluorescence et l'identification des mycoplasmes », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1969, **22** (4): 481.
9. PERREAU (P.) et MONNIER (J.), « Recherche des anticorps anti-*Mycoplasma mycoides* au moyen d'un test de floculation », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1970, **23** (4): 409.
10. PROVOST (A.), « Rapport annuel du laboratoire de Farcha », 1966, tome II, p. 18.
11. RAZIN (S.) et ROTTEM (S.), « Identification of mycoplasma and other organisms by polyacrylamide-gel electrophoresis of cell proteins », *J. Bact.*, 1967, **94**: 1807.
12. TAYLOR-ROBINSON (D.) et collab., « A colour-test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid production », *J. Hyg. Camb.*, 1966, **64**: 91.